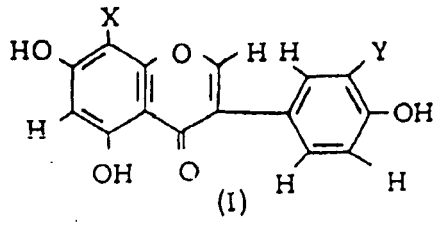
27437A/15 B02 D16 MICR- 19.06.74
MICROBIOCHEMICAL RE *J5 0160-483
19.06.74 JA-069119 (25.12.75) A23k A61k C12d

Physiologically active iso-flavone prodn. - by aerobically culturing Aspergillus on potato starch, glucose, soybean medium

Isoflavones (I)



(X = MeO, OH; Y = OH, H)

(I)

are produced by an aerobic culture of fungi; 3',4',5,7-tetrahydroxy-8-methoxyisoflavone (II), psi-tectorigenin (III, X = OMe, Y = H), and 8-hydroxygenistein (IV, X = OH, Y = H) are produced by Aspergillus.

USE

L-Dopa decarboxylase inhibitor.

EXAMPLE

A. niger NRRL 3122 was cultured with shaking at 27°C for 5 days on a medium (pH 6.0) contg. potato starch 2 glucose

B(6-A1) D(5-C), I 77

1, soybean meal 2, KH_2PO_4 0.1, and $MgSO_4 7H_2O$ 0.05%; the pH changed to 5.6, 3.6, 3.2, 5.0 and 6.2 after 1, 2, 3, 4, and 5 days of the cultivation. The culture filtrate (9 l.) was extd 3 times with 4.5 l. BuOAc at pH 2.0. The cells (1.2 kg) are also extd. with 5 l. MeOH and concd. to dryness. The active substances were extd. with 1 l. water (pH 8.0) and then with 0.5 l. BuOAc 3 times at pH 2.0 and combined with the above extract of the culture filtrate. The combined extract was concd. to dryness yielding 12.3 g tar substance. It was subjected to silica gel chromatography eluting with $CHCl_3$-MeOH (50:1) to separate (III), genistein (V), (II), orobole (VI) and (IV). Each fraction was dried, subjected to "Sephadex LH-20" (RTM) silica gel chromatography and crystd. from MeOH-C_6H_6. Yields were 15.8, 4.8, 80.3, 0.1, and 4 mg for (II), (III), (V), (VI) and (IV). They were sol. in alkaline water, MeOH, EtOH, BuOH, Me_2CO, DMSO and hardly sol. in C_6H_6, $CHCl_3$ and toluene. ID_{50} against β-3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine decarboxylase were 0.2, 51.0, and 2.6 μg/ml for (II), (III) and (IV). (14pp-).

Search Title: gt23.opt User: cpath
PAN: 78-27437a, Page 1 of 1, Thu Mar 2 16:02:41, VIEWED MARKED
BEST AVAILABLE COPY

⑲ 日本国特許庁

公開特許公報

⑪特開昭 50-160483

㊸公開日 昭50.(1975) 12.25

㉑特願昭 49-69119

㉒出願日 昭49.(1974) 6.19

審査請求 未請求 (全14頁)

庁内整理番号

7110 49
6617 44
7169 44

㊷日本分類

36(2)D521
30 A32
16 E41

㊶Int.Cl²

C12D 13/00
A61K 37/64
A61K 31/35
A23K 1/16

特許庁
(2000円)
第 2 号 収入印紙なし
特 許 願 (特許法第38条ただし書の規定による特許出願)
昭和49年6月19日
特許庁長官殿
1. 発明の名称 生理活性を有するイソフラボン化合物の微生物による製造
2. 特許請求の範囲に記載された発明の数 4
3. 発明者
住所 東京都練馬区豊玉北4丁目23番地
氏名 梅沢浜夫 外2名
4. 特許出願人
住所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号
名称 財団法人微生物化学研究会
代表者 市川篤二
5. 代理人
住所 〒105 東京都港区西新橋1丁目2番9号
三井物産館内 電話(591)0261番
(2400) 氏名 金丸教男
19 069119

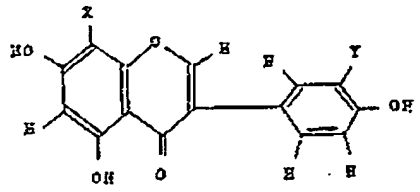
明細書

1. 発明の名称

生理活性を有するイソフラボン化合物の微生物による製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 糸状菌に属する次の一般式



(I)

(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)のイソフラボン化合物の生産菌を好気的に培養して該化合物を生成せしめ、培養物から該化合物を採取することを特徴とする、微生物による上記一般式(I)のイソフラボン化合物の製造法。

(2) アスペルギルス属に属する3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン生産菌を好気的に培養して該化合物を生成せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボンの製造法。

(3) アスペルギルス属に属するプサイ・テクトリゲニン生産菌を好気的に培養して該化合物を生成せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、プサイ・テクトリゲニンの製造法。

(4) アスペルギルス属に属する8-ハイドロキシゲニステイン生産菌を好気的に培養して該化合物を生成せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、8-ハイドロキシゲニステインの製造法。

3. 発明の詳細な説明

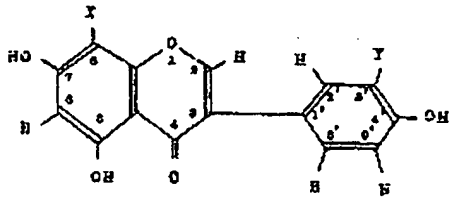
本発明は微生物を用いる醗酵法によりドーパ脱炭酸酵素に対して阻害作用をもつ新規物質3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン、あるいは公知物質4',5,7-トリハイドロキ

シ－８－メトキシイソフラボン（すなわちプサイ・テクトリゲニン｛psi－tectorigenin｝）又は5',6,7,8－テトラハイドロキシイソフラボン（すなわち８－ハイドロキシゲニステイン｛8－hydroxy－genistein｝）を製造する方法に関する。

本発明者等は人の高血圧症及びバー・キンソン氏病のドーパでの治療における経済薬の開発を目的として、微生物の培養液中にアロマティックアミノ酸類のカルボキシル基を脱炭酸するドーパ脱炭酸酵素（以下D.D.Cと略記する）の作用を阻害する物質を系統的に探索し、動物血の培養液及び組織中にD.D.C阻害物質が各種存在することをみいだし、これらを抽出単離し化合構造を究めイソフラボン骨格を持つ３種の化合物である事を発見した。さらに化学的な詳細な研究から、これら化合物の一つは新規化合物である3',4',5,7－テトラハイドロキシ－８－メトキシイソフラボンである事を明かにするとともに他の二つの化合物が4',5,7－トリハイドロキシ－８－メトキシイソフラボン及び4',5,7,8－テトラハイドロキシイソフラボ

ンであることを同定した。またこれら３種の化合物を微生物の培養物から採取する方法を発明した。

上記の二つのイソフラボン化合物は次の一般式

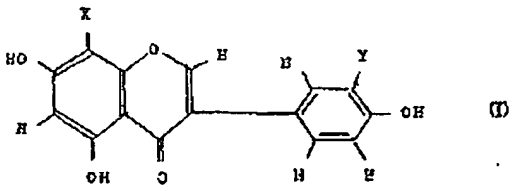


(I)

〔式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である〕で表わされるが、一般式(I)においてXがメトキシ基及びYがヒドロキシ基である場合の化合物が新規物質3',4',5,7－テトラハイドロキシ－８－メトキシイソフラボン（以下では化合物(i)ともいう）であり、Xがメトキシ基及びYが水素原子である場合の化合物がプサイ・テクトリゲニン（以下では化合物(ii)ともいう）であり、さらにXがヒドロキ

シ基でYが水素原子である場合の化合物が８－ハイドロキシゲニステイン（以下では化合物(iii)ともいう）である。

それ故、本発明の要旨とするところは、糸状菌に属する次の一般式、



(I)

〔式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である〕のイソフラボン化合物の生産菌を好気的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することを特徴とする、微生物による上記一般式(I)のイソフラボン化合物の製造法である。

本発明以前においては、前記化合物(I)は天然物

としても化学合成物としても報告されておらず本発明者らが初めて発見した新規物質である。また化合物(iii)は、テクトリゲニンの脱メチル誘導体として、ウイルソン・ベイカー等（Wilson Baker et al）により１９５３年初めて合成され Chemistry and Industry March 277，1953，に報告されており、化合物(ii)については１９６０年ブダペスト工科大学のエル・ファルカスとジェー・バラディ（L. Farkas and J. Várady）により合成され Acta chimica Academiai Scientiarum Hungarical 24，225～230，1960に報告されているが、いずれの化合物も微生物の培養物より採取したのは本発明者らが最初である。さらに本発明者らはこれら化合物(I)，(ii)，(iii)の各種生理活性に対する阻害作用の研究から、D.D.C阻害活性を有することの他、これら化合物がヒスチジン脱炭酸酵素（以下ＨＤＣと略記する）阻害活性、カテコールオーメチル転位酵素（以下ＣＯＭＴ と略記する）阻害活性及びエストロゲン活性を有することを発見した。これら新規阻害活性は本発明者らにより

初めて明らかにされ、これ以前には知られていなかつた。以上のβ-菜菌作用性を有する化合物(I)、(II)、(III)は、D.D.C及びOOMT活性を阻害することから、パキンソン氏病のドーパでの治療における延長剤として、ノルアドレナリンの生合成を阻害することにより高血圧症の治療薬、HDC活性を阻害することから、抗アレルギー、抗炎症、の治療薬として、またエストロゲン活性を有する事から避妊及び動物での体重増加、生育促進剤としての用途等が考えられる。

本発明の方法で用いる糸状菌に属する一般式(I)の化合物の生産菌の一例としてはアスペルギルス・ニガーNRRL 3122 (Aspergillus niger NRRL 3122) があり、このアスペルギルス・ニガーNRRL 3122株は、米国農務省農業研究局北部利用研究開発部(NRRL)に保存された公知の保存菌であつて本発明者らがNRRLより分譲を受けたものである。なお、このアスペルギルス・ニガーNRRL－3122株は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第2063号として寄託されてある(昭和46年6月25日保管寄託申請)。

微生物は人工的に、又自然界においても変異を起しやすいが本発明にいうアスペルギルス・ニガーNRRL 3122はその変異菌の全てを包括する。本発明に云う菌株はイソフラボン化合物(I)、(II)、(III)を生成し、これらの菌及び変異菌と明確に区別されないものはすべてこれを包括する。

それ故、本発明の第一の実施態様によれば、アスペルギルス属に属する5,6,6,7－テトラハイドロキシ－8－メトキシイソフラボン生産菌を好気的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することからなる、5,4',6,7－テトラハイドロキシ－8－メトキシイソフラボンの製造法が提供される。

また、本発明の第二の実施態様によれば、アスペルギルス属に属するプサイ・テクトリゲニン生産菌を好気的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することからなる、プサイ・テクトリゲニンの製造法が提供される。

さらに、本発明の第三の実施態様によれば、アスペルギルス属に属するβ－ハイドロキシゲニステイン生産菌を好気的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することからなる、β－ハイドロキシゲニステインの製造法が提供される。

本発明の方法を実施するに当つては、使用生産菌を微生物の通常公知の培養法で好気的に培養して培養物中に目的化合物を生産せしめることができる。また本発明の目的化合物(I)、(II)、(III)を生産せしめるためにカビ、放線菌その他の微生物の培養に用いられる栄養源はすべて利用できる。例えば炭素源としてはグルコース、マルトース、デキストリン、澱粉、ラクトース、サツカロース、グリセリンなど、又窒素源としてはペプトン、肉エキス、酵母、麦芽エキス、大豆粉、綿実粉、落花生粉、コーンスチープリカー、米ぬか、無機窒素化合物などを利用できるが、特に化合物(I)、(II)、(III)の生産のためには、グルコース、澱粉を炭素源とし、大豆粉を窒素源とした培地が、これら化合物の生産のため好ましい培地である。化合物(I)、(II)、(III)を生産せしめるため必要とするならば、微量塩、金属塩、重金属塩の塩類を加えることもできる。また培養初期中にあるいは培養途中に消泡を必要とする時はシリコン樹脂、大豆油、アデカノール等の消泡剤を使用できる。

化合物(I)、(II)、(III)の生産のための培養温度は20～30℃が好ましく、化合物(I)、(II)、(III)は好気的に振盪して得られるが、ペニシリン等の抗生物質の生産のために用いられる。液とう培養法、通気撹拌タンク培養法がそのまま本発明のために用いられる。

化合物(I)、(II)、(III)の生産菌の一例であるアスペルギルス・ニガーNRRL3122を、グルコース1%、肉鉛物デンプン2%、ソイピーンミール2%、KH_2PO_4 0.3%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%を含む生産培地に接種し27℃で6日間振とう培養した時培養液のpHは6.0程度になり、化合物(I)、(II)、(III)の生産は最高に達する。また化合物(I)、(II)、(III)の培養液中での生産濃度は、前述した、培養での諸条件によつて異なるが専門家にとつて公知

の都度である。したがつて菌株の改良，培養条件の選択によつて単一の化合物のみを生産せしめるか，特定の化合物を合理的に生産せしめるかは専門家にとつて容易なことである。この発明はそれ等のすべての修飾方法をも包括するものである。さらにアスペルギルス・ニガーBRFL3122を上述の如く培養したとき，培養物中に公知化合物オロボールおよびにゲネステイン（何れもイソフラボンの一種）を集積していることが認められた（本出願人の同日出願に係る特願昭49－

号明細書参照：発明の名称「微生物によるオロボールの製造法」）。化合物(I)，(II)，(III)の定量はD.D.Cの阻害度を測定することによつて定量できる。D.D.C活性阻害はアワバラ等の方法（J. Biol. Chem；235，124，1960）に従つて測定されるが詳細は下記のとおりである。

Lードーパ1×10^{-3}モル/l，ピリドキサールリン酸7.5×10^{-5}モル/l，ドーパデカルボキシラーゼ（この条件下でOD279mμ=0.3を得る酵素量，通常，蛋白量1mg/ml）0.05ml，リ

ン酸緩衝液（pH 6.9）0.3モル/l，インドロニアジド（IPRONIAZID）1×10^{-3}モル/lを合わせ，水で全容1.8mlとする。この混合液を37℃，25分間反応させ，初製するドーパミンを陽イオン交換樹脂アンバライトCG-50（ローム・アンド・ハース社製）アンモニア型に吸着させ，水洗後，1N塩酸で溶出し，紫外部279mμの吸収を測定した。その値より生成ドーパミン量を定量し，阻害率を求めた。

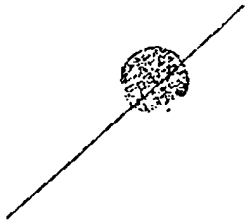
次に化合物(I)，(II)，(III)の抽出，精製について記述する。これ等の化合物はアルカリ水，メタノール，エタノール，アセトン等に極めて良く溶解し，ブタノール，酢酸エチル，酢酸ブチル等にも溶解する。培養液中のこれら化合物は酸性で酢酸ブチル，酢酸ブチル等で抽出される。これら化合物は熱に安定であり，100℃3分間の加熱により，活性は低下しない。又60℃30分間の加熱で，pH 3.0，7.0，8.0で安定である。また化合物(I)，(II)，(III)はpH 2.0で酢酸ブチルに溶けることから，これら化合物は弱酸性物質である。この性

質に基づいて，培養沪液中の菌体部分に存在している，これら化合物はpH 2.0でブタノール，酢酸エチル，酢酸ブチル等に抽出される。一方，菌体中の化合物(I)，(II)，(III)は水と混じる有機溶剤，例えば，メタノール，エタノール，アセトン，等で抽出し，減圧濃縮によつて除去し，これをpH 8.0のアルカリ水に溶解し，不溶部分をのぞいたのち，培養沪液と同様に溶解液を酸性（pH 2.0）に調整後ブタノール，酢酸ブチル，酢酸エチル等に抽出し，培養沪液から化合物(I)，(II)，(III)を抽出した溶剤と混合して減圧濃縮する。

上記の減圧濃縮物を，シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い，クロロフォルム：メタノール50：1の混合溶剤で溶出するとD.D.C活性を有する5つの分画にわけられる。すなわち，フラクション80～90にα-アクトラグニン【化合物(III)】，フラクション95～55にゲニステイン，フラクション55～75に新規化合物(I)，フラクション70～80にオロボールが，最後のフラクション100～120に8－ハイドロキシダ

ニステイン【化合物(II)】が溶出分離される。これらのイソフラボン誘導体のそれぞれを減圧濃縮し，メタノールに溶解し，セファデックスLH－20等により精製する。更にその活性部をシリカゲル（60－7－200～325メッシュ－マリンクロット）等のクロマトグラフィーを利用して，精製できる。化合物(I)，(III)，(II)は融点を有し，例えばベンゼンから結晶化される。

次に本発明によつて明らかにされた化合物(I)，(II)，(III)の理化学的性状，及び生物学的性状について記載する。



A) 化合物(I)，(II)，(III)の理化学的性質

本発明によつて得られる化合物(I)は、淡褐色の、板状結晶であり、２８２℃で溶解分解する。元素分析の結果の一例はC；６０.６５％；H；３.８６％；O；３５.４９％で炭素及び他の元素は含まれない。マススペクトルグラフィーでm/e＝３１６が与えられ、$C_{16}H_{12}O_7$の分子式を有する。なお、$C_{16}H_{12}O_7$の分子式を有する化合物の元素分析の理論値は、C；６０.７６％ H；３.８８％ O；３５.４３％である。又、化合物(I)はアルカリ水、メタノール、エタノール、プタノール、アセトン、ジメチルスルホキサイド等に良く溶解するが、ベンゼン、クロロフオルム、トルエン等に溶けにくい。

紫外線吸収スペクトル曲線では、メタノール溶液で２６８mμ（$E^{1\%}_{1cm}$＝９６０）、２９５mμ（$E^{1\%}_{1cm}$＝３５０）に吸収極大を有する。又、０.０１規定塩酸を含む酸性メタノール溶液では、２６８mμ（$E^{1\%}_{1cm}$＝９８０）、２９５mμ（$E^{1\%}_{1cm}$＝３６０）に吸収極大を、０.０１規定水酸化ナトリウムを含

むアルカリ性メタノール溶液中では２７９mμ（$E^{1\%}_{1cm}$＝８６０）、３４５mμ（$E^{1\%}_{1cm}$＝４２０）に吸収極大を示す。

臭化カリウム錠として赤外線吸収スペクトルを測定すると、波数３４０，１６８０，１５３０，１４５０，１３８０，１２７０，１２４０，１１８０，１１１５，１０８５，１０３８，９９８，９１０，８６５，８３０，７８０，７３０，６８０cm^{-1}に吸収が見られる。

定性反応は、塩化第二鉄反応、２,６－ジクロロキノンクロルイミド反応、２,４－ジニトロフエニルヒドラジン反応は陽性、エールリツヒ反応、ニンヒドリン反応は陰性である。シリカゲルの薄層クロマトグラフィーでは、クロロフオルム：メタノール１０：１でRf値０.３８も、酢酸エチル：メタノール２０：１でRf値０.７０である。

この化合物(I)の１００メガヘルツの核磁気共鳴スペクトルに於いて、重アセトン中でδ１３.０付近に水素結合した水酸基の１個のプロトン、δ８.２０にイソフラボン骨格のプロトンが１個、δ７.１８、６.９２ppmにそれぞれ１個と２個の芳香

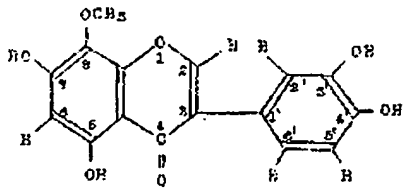
族性のプロトンがあり、カップリングをしている。更に、δ６.３６ppmに芳香族性のプロトンが１個存在する。δ３.８６ppmにメトキシ基１個が存在する。又、オーバーハウザー効果の測定により、メトキシ基は８位に結合していることが示唆された。

ジメチル硫酸でメチル化を行なうと、４個のメチル基が導入され、テトラメチル体が得られる。このメチル体のメトキシ基に関して、オーバーハウザー効果を測定することにより、置換基の位置が５′、４′、８、７、６位であることが決定された。又、無水酢酸でアセチル化すると、アセチル基が４個導入され、テトラアセチル体を得ることができた。これにより、フエノール性の水酸基が４個存在することが決定された。更にこのアセチル体を重クロロフオルムに溶かし１００メガヘルツの核磁気共鳴スペクトルを検討することにより、このアセチル体のB環のプロトンのカップリングの様式が明らかになつた。これによりB環の置換様式は１，２，４置換様式であることが決定された。

すなわち、B環の置換基の位置は、１′，３′，４′位であることが決定された。

紫外線吸収の極大が塩化アルミニウムの添加により１４mμ長波長にシフトすることにより、５位に水酸基が、酢酸ソーダ添加により１１mμ長波長にシフトすることにより、７位にそれぞれ水酸基が存在することが決定された。

以上の結果により、化合物(I)は次の構造式を有するところの、３′，４′，５，７－テトラハイドロキシ－８－メトキシイソフラボンであると決定した。



化学物(II)，(III)の構造は化合物(I)の構造を決定し

た方法と全く同じ方法で決定し、化合物(II)はゲーサクトリゲニン、化合物(III)は8-ハイドロキシイソフラボンであることを決定した。これら化合物(I)，(II)の理化学的諸値は表1に示す。

表 1

	ゲーテクトリゲニン	8-ハイドロキシゲニステイン
形状	黄色針状	淡色粉末
融点	245℃	320℃
元素分析	C:64.36 H:4.09 O:31.65	
理論値	C:64.00 H:4.03 O:31.97	
分子式	300	286
マススペクトル m/e	300	286
紫外部吸収スペクトル	メタノール溶液	260mμ(E$^{1\%}_{1cm}$=805),299mμ(sh),311mμ(sh)
	0.01N塩酸メタノール溶液	269mμ(E$^{1\%}_{1cm}$=1087),325mμ(sh)	276mμ(E$^{1\%}_{1cm}$=410),330mμ(sh)
	0.01N塩酸アルカリメタノール溶液	283mμ(E$^{1\%}_{1cm}$=1358),330mμ(sh)	290mμ(E$^{1\%}_{1cm}$=643),330mμ(sh)
赤外部吸収スペクトル		3286,1666,1620,1505,1490,1430,1385,1340,1280,1238,1165,1036,996,983,842,838cm^{-1}	3450,1672,1578,1541,1521,1481,1312,1290,1240,1197,1015,822cm^{-1}
塩化鉄二硫反応	褐色	褐色
2,6-ジクロロキノンクロルイミド反応	陽性	陽性
ズールリッヒ反応	陰性	陰性
ニンヒドリン反応	陰性	陰性
薄層クロマトグラフィーのRf値		
クロロフォルム：メタノール 10:1	0.40	0.57
酢酸エチル：メタノール 20:1	0.05	0.60
核磁気共鳴スペクトル		
δ15ppm付近の水素原子のシグナル	1個	1個
δ7ppm付近のシグナル	1個	1個
A環の置換様式	5,7,8位に置換基	5,7,8位に置換基
B環の置換様式	2',4'に置換基	3',4'に置換基
メトキシ基の位置	8位	
塩化アルミニウム錯形成による紫外部吸収大波長のシフト	+23mμ 5位に水酸基	+18.0mμ 5位に水酸基
酢酸ソーダ添加による紫外部吸収大波長のシフト	+10mμ 7位に水酸基	+8.5mμ 7位に水酸基
構造式		

b) 化合物(I)，(II)，(III)の生物学的性状

a) 化合物(I)，(II)，(III)の毒性は8.5%ジメチルスルホキサイド水溶液に溶解して、マウスの腹腔内に投与したときいずれの化合物も250mg/kgで毒性を示さなかつた。

b) 化合物(I)，(II)，(III)の各酵素活性に対する阻害活性、(a) D.D.C の阻害活性は前述の方法で測定した時の化合物(I)，(II)，(III)の50%阻害濃度はそれぞれ表2に示したとおりであつた。

表 2

化合物名	D.D.C 50%阻害濃度
I	3.2 μg/cc (8.0×10⁻⁷M)
II	61.0 μg/cc (2.7×10⁻⁴M)
III	2.8 μg/cc (9.2×10⁻⁸M)

(b) HDCの阻害活性は下記に示す方法にしたがつて測定した。すなわちL-ヒスチジン-2-^{14}C (1.0×10⁵ cpm) を5.8×10⁻⁶M、ピリドキサールリン酸5.7×10⁻⁵M、ヒスチジンデカル

ボキシラーゼ (蒸留水1mg/cc) 0.1cc、リン酸緩衝液 (PH 6.8) 0.067Mの混合液に0.1ccの検定する試料を入れ、脱イオン水で全量を3.0ccとし、37℃で2時間反応させ、生成したヒスタミン-2-^{14}Cをアンバーライト CG-50 アンモニア型に吸着させ、水洗後、1N定アンモニア水で、生成ヒスタミンを溶出させ、プレイのシンチレータを8cc加え、その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、生成ヒスタミン量を求める。このように測定したときの化合物(I)，(II)，(III)のHDCの50%阻害活性は表3に示した。

表 3

化合物名	HDC 50%阻害濃度
I	3.6 μg/cc (1.1×10⁻⁵M)
II	39.0 μg/cc (1.3×10⁻⁴M)
III	0.7 μg/cc (2.3×10⁻⁶M)

(c) COMTの阻害活性はニコデジエビック等が報告した方法に準じて測定した。(D. Nikodijevic

et al ; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 174 83～93, 1970) このように測定した時の化合物(I)，(II)，(III)のCOMTの50%阻害活性は表4に示したとおりであつた。

表 4

化合物名	COMT 50%阻害濃度
I	6.5 μg/cc (2.0×10⁻⁶M)
II	8.8 μg/cc (2.9×10⁻⁵M)
III	1.0 μg/cc (3.5×10⁻⁶M)

(d) エストラジオールに特異的に結合する子宮細胞に対する結合阻害活性測定法は、スタンレイの方法 (D.K. Stanley ; Journal Clinical Endocrinol and Metabolism 28, 127, 1968) に準じて測定した。エストラジオールが結合するのを50%阻害する化合物(I)，(II)，(III)の濃度は表5に示したとおりであつた。

表 5

化合物名	50%阻害濃度
I	2.1 μg/cc (6.0×10⁻⁶M)
II	2.7 μg/cc (9.0×10⁻⁶M)
III	>20.0 μg/cc (>7.0×10⁻⁵M)

本発明により新規化合物(I)および化合物(II)，(III)が糸状菌等の微生物によつて作られることが明らかにされたので、この明細書に記された知見に基づいて、本明細書に記された方法を修飾した方法が容易に想到される。諸製造物質の生産は特定の菌種に限らない。他の糸状菌を用いてこれを生産することは、専門家にとつて容易なことである。本発明はそのすべての修飾方法を包括し、以下に示す実施例はその例示であつて、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例 1

アスペルギルス・ニガー NRRL 3122株 (微工研菌寄第2063号) をポテトデキストロース寒天斜面培地に14日間生育させ、そこから一白金

澱粉を馬鈴薯デンプン8%、グルコース1%、ソイビーンミール2%、KH_2PO_4 0.1%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%を含む培地1.5lを5000ml容量の振とうフラスコに分注し、120℃で20分間滅菌したものに接種し、27℃で毎分130往復の振とうで5日間培養した。pHは播種前6.0、1日後5.6、2日後5.6、3日後5.2、4日後5.0、5日後6.2であつた。

上記5日間培養後の培養液は1ml中1γの濃度の化合物(I)を、化合物(II)を0.3γ、グニステイン5γ、6-ハイドロキシグニステイン0.05γを含有していた。又培養液10lより得られる菌体に5lのメタノールを加えインフラボン骨格を有する化合物を抽出した。このメタノール抽液1ml中には化合物(I)は2γ、化合物(II)は0.5γ、グニステインは5γ、化合物(III)は0.05γ含まれていた。この培養液10lを戸過して清澄な戸液9lと菌体固形物1.8kgが得られた。培養戸液は2N-塩酸でpH 2.0 とし、4.5lの酢酸ブチールで3回抽出した。菌体固形

物は5lのメタノールを加えよく撹拌抽出戸過し4.8lのメタノール抽出液が得られた。このメタノール抽出液を減圧濃縮乾固した後、1lの水を加え、2N-NaOH液でpH 8.0となし析出し不溶部を除く、D.D.C阻害活性はそのほとんどが可溶部に存在する。この可溶部分を2N-HClでpH 2.0となし、600mlの酢酸ブチールで3回抽出振盪した。この抽出液と前記培養戸液よりD.D.C阻害物質を抽出した酢酸ブチールを合せて、減圧濃縮乾固して、黒褐色のタール物質12.5gを得た。このもののD.D.Cに対する50%阻害値は3γ/mlであつた。このタール物質をメタノール100mlに溶解し30gのシリカゲル(マリンクロット社製シリシリック・アシドCC-7スペシャル)を加えて減圧濃縮乾燥し、これをクロロホルム:メタノール(5:1)の溶媒系で上記シリカゲル30gをゲル化させ5.6cm×65cmのカラムにつめ、その上端に乾燥物をのせ、上記の溶媒系でカラムクロマトグラフィーを行い20mlの分画で溶出するとD.D.C阻害分画は5ケの分画に分

離された。このシリカゲルのクロマトグラフィーにより、フラクション№20～30に化合物(I)が№25～55にグニステイン、58～78に化合物(II)、№76～80にオロボール、№100～120に化合物(III)が、それぞれ溶出された。それぞれの活性部分をあつめ減圧下に濃縮乾固した後、それぞれを5mlのメタノールに溶解し、メタノールで膨潤させたセファデックスLH-20を充填した2cm×100cmの塔に通せ、メタノールにより展開しD.D.C阻害活性分画をあつめ濃縮乾固した。この乾固物をさらに精製する目的でそれぞれを10mlのメタノールに溶解し、それぞれにシリカゲル(マリンクロット社製シリシリックAR00-7、200～325メッシュ)10gを加えて減圧濃縮乾燥し、これを、クロロホルム:メタノール(100:1)の溶媒で上記と同じシリカゲル60gをゲル化させ3.2cm×30cmの塔につめ、その上端に乾燥物をのせ上記の溶媒系でカラムクロマトグラフィーを行うと、それぞれ精製された1つのピークとなつた。この活性部分を集め減圧

下で濃縮するとそれぞれの結晶が得られた。これらの粗結晶をメタノール-ベンゼンから再結晶しそれぞれの結晶を得た。これらの試験で化合物(I)が25.8mg、化合物(II)が4.8mg、グニステインが80.5mg、オロボールが0.1mg、化合物(III)が4mgのそれぞれの結晶が得られた。

実施例 2

ジャーによる培養は、実施例1のフラスコ培養の場合と同様な培地を作製し、アスペルギルス・ニガーIFRI3122(微工研菌寄第2003号)の斜面培養から一白金耳量を接種し、二日間培養したものを種母とする。馬鈴薯デンプン2%、KH_2PO_4 0.1%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%を含む培地15lを30l容のジャーに仕込み、120℃、30分間殺菌し、これに先きの種母を2%添加し、温度27℃、毎分200回転撹拌、通気量毎分10lで5日間培養した。この培養液12lをバスケット型遠心機で戸過し、18lの戸液を得た。実施例1と同様に酢酸ブチール6lで3回抽出しこれを減圧濃縮し、15gのタール状物質を得た。

とのp液収率は６６％でもつた。固体部分にはメタノール６Ｌを加え、D.D.C阻害活性物質をメタノールに溶出せしめ、このメタノールを分離し、減圧濃縮することにより、２０９のタール状物質を得た。この活性収率は７０％であつた。戸液及び固体から得たタール状物質をシリカゲル（ＣＣ－７－スペシャル－マリンクロット）５００９を充填したクロマト管で分画，精製し，D.D.C阻害活性を有する５つの分画を得る。実施例１と同様にそれぞれをセファデックスLH－２０，１００９のクロマトグラフィーで精製し，さらにシリカゲル（マリンクロット社製シリシリックＡＲＣＣ－７２００～３２５メッシュ）５００９を充填したクロマト管をもちいクロマトグラフィーを行ない精製し，メタノールベンゼンから結晶化させた。この場合は２０.８㎎の化合物(I)，７.８㎎の化合物(II)，１１５㎎のゲニステイン，０.２㎎のオロボール，５.２㎎の化合物(III)の結晶を得た。

実施例　Ｂ

タンクによる培養は実施例１と同様にして消泡

比迄で回収に溶解し以下の量のイソフラボン誘導体の結晶を得た。即ち化合物(I)を１８０㎎，化合物(II)を１０.２㎎，ゲネステインを１００㎎，オロボールを２０.８㎎，および化合物(III)を４５.５㎎，各々の結晶として得た。

4.図面の簡単な説明

第１図は化合物(I)の純メタノール溶液（曲線ａ），０.０１規定塩酸を含む９０％メタノール溶液（曲線ｂ），及び０.０１規定水酸化ナトリウムを含む９０％メタノール溶液（曲線ｃ）中の紫外部吸収スペクトル曲線を示す。

第２図は第１図と同様な溶剤中での化合物(II)の紫外部吸収スペクトル曲線を示す。

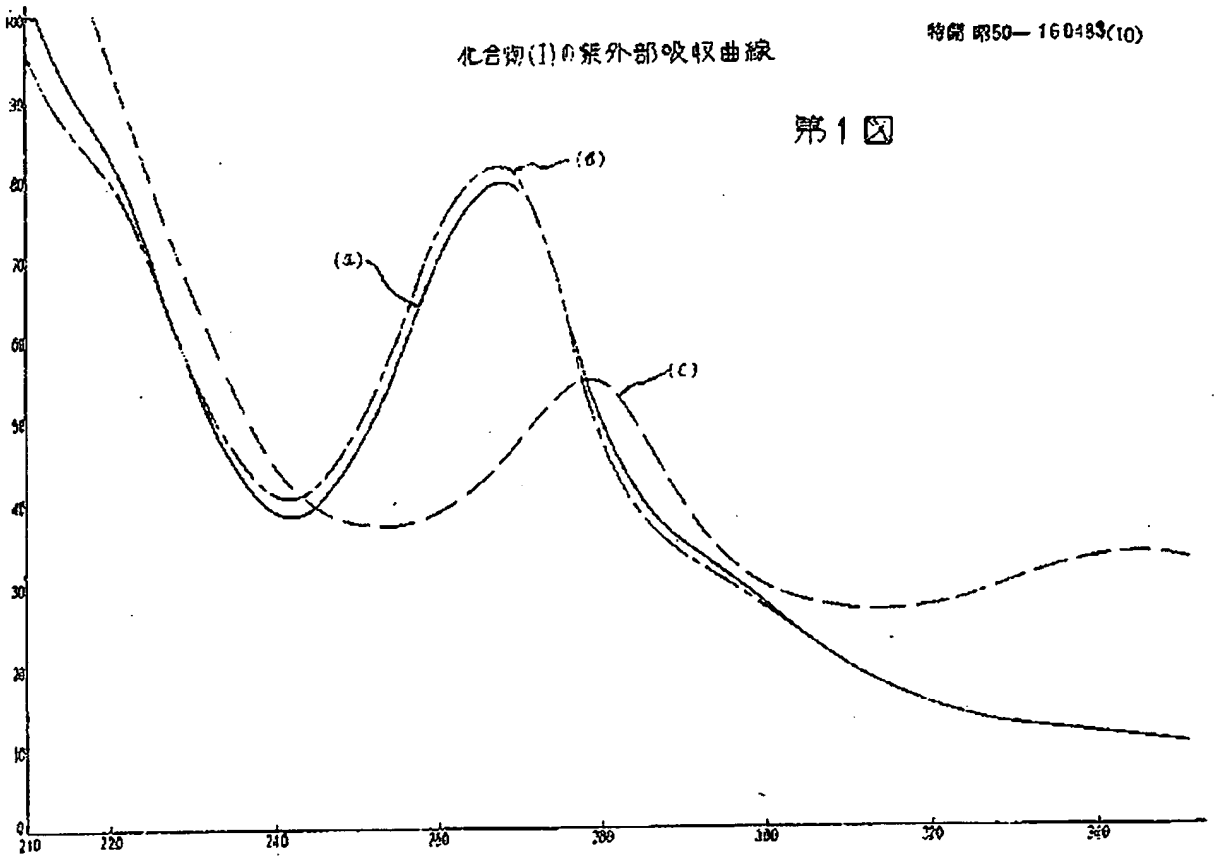
第３図は第１図と夫々同様な溶剤中での化合物(III)の紫外部吸収スペクトル曲線を示す。

第４図，第５図，第６図はそれぞれを臭化カリウム錠剤中で固定した時の化合物(I)，(II)，(III)の赤外吸収スペクトル曲線を示したものである。

した培母を第１次種母とし、実施例２と同様にして作製した培母を第２種母として、２００９容のステンレススティール製タンクに実施例１と同様な培地を１５０Ｌ仕込み、シリコン樹脂を０.０１％加え１１５℃、３０分間滅菌し、これに第２次種母を５２種添し毎分２００回転で攪拌し、２ヶ月で５日間培養した。この培養液をフィルタープレスで戸過し１２０Ｌの培養戸液と固体２１㎏を得た。培養液は実施例１及び２と同様に燐酸でpH ２.０とし燐酸ブチル６０Ｌで３回抽出液中に含まれているD.D.C阻害物質を抽出した。又固体固形部分に含まれるD.D.C阻害物質の抽出は６０Ｌのメタノールを加え、かく拌、抽出、戸過し，メタノール抽出液５５Ｌを得た。このメタノール溶液を減圧、濃縮、乾固し、一定量の水酸化ナトリウムを溶かつつ１０Ｌの水（pH ８.０）に溶解した。この溶液に塩酸を加え，pH ４.０とし、燐酸エチル６Ｌで３回抽出した。この燐酸エチル抽出液は、培養戸液より抽出した燐酸エチルとあわせ減圧濃縮乾固し以後実施例１と同様の

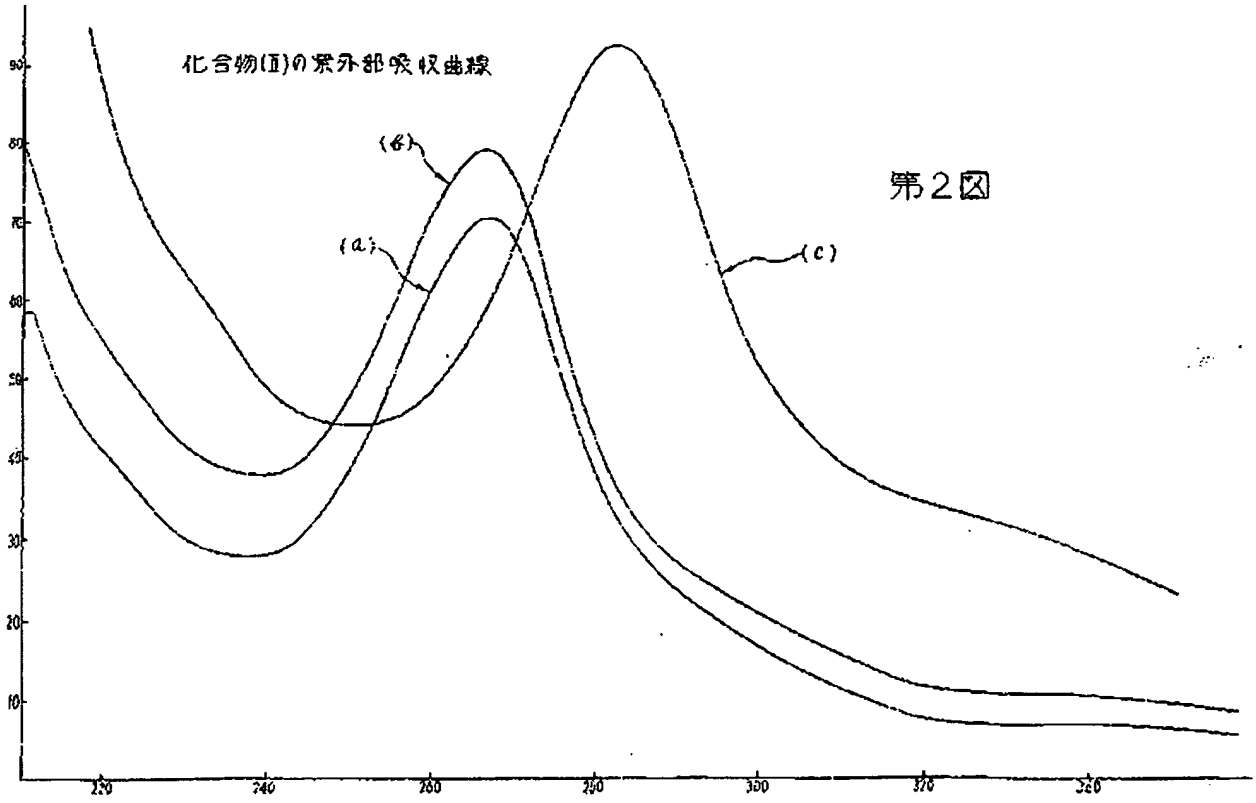
化合物(I)の紫外部吸収曲線

第1図

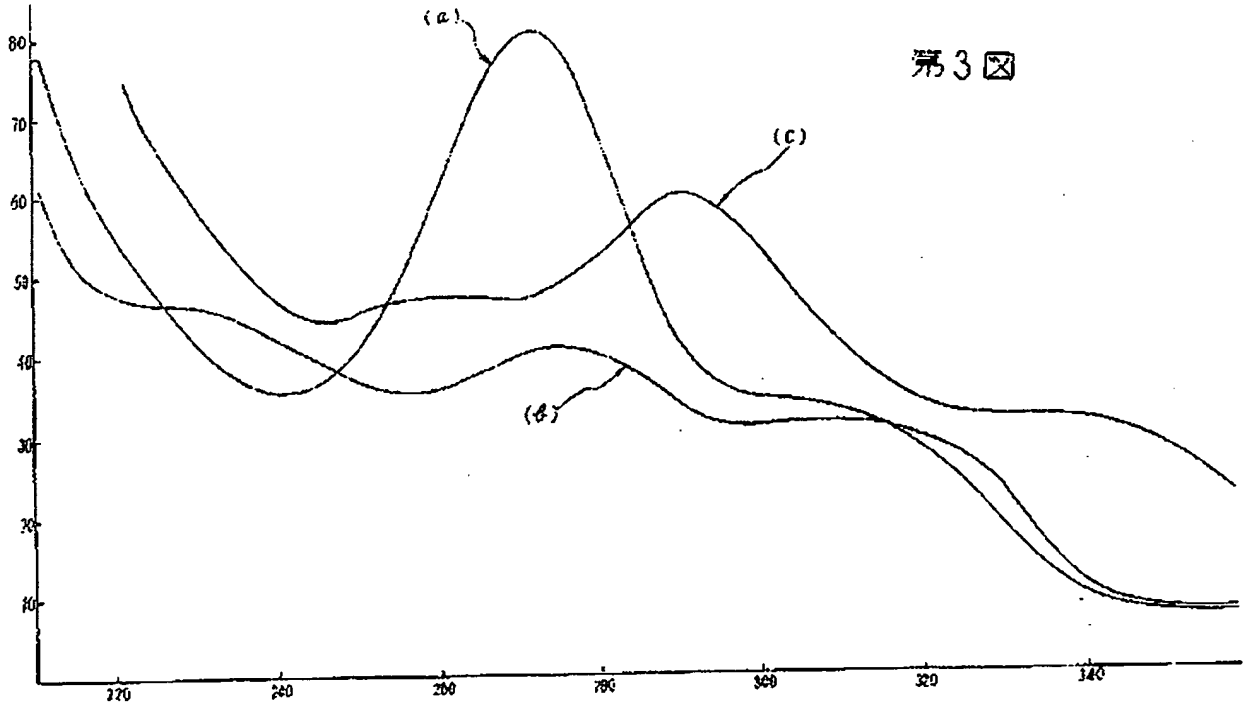


化合物(II)の紫外部吸収曲線

第2図



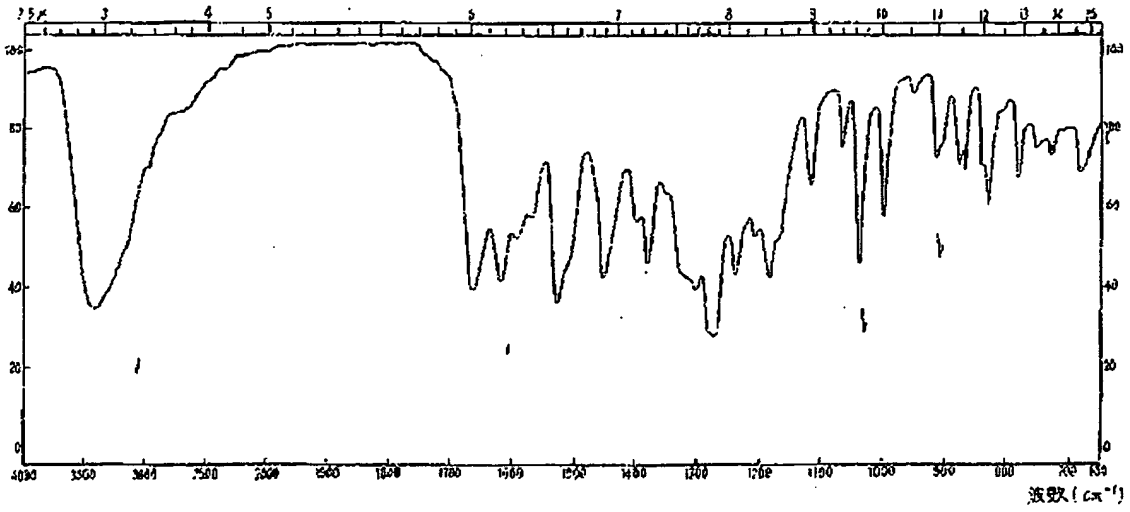
化合物(Ⅲ)の紫外部吸収スペクトル曲線



第3図

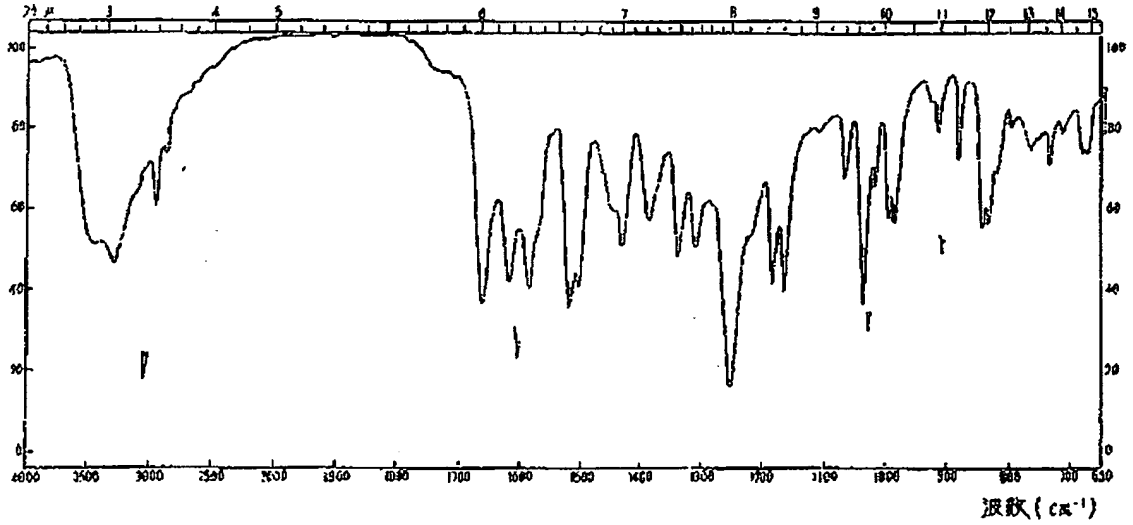
第4図

化合物(Ⅰ)の赤外吸収スペクトル曲線



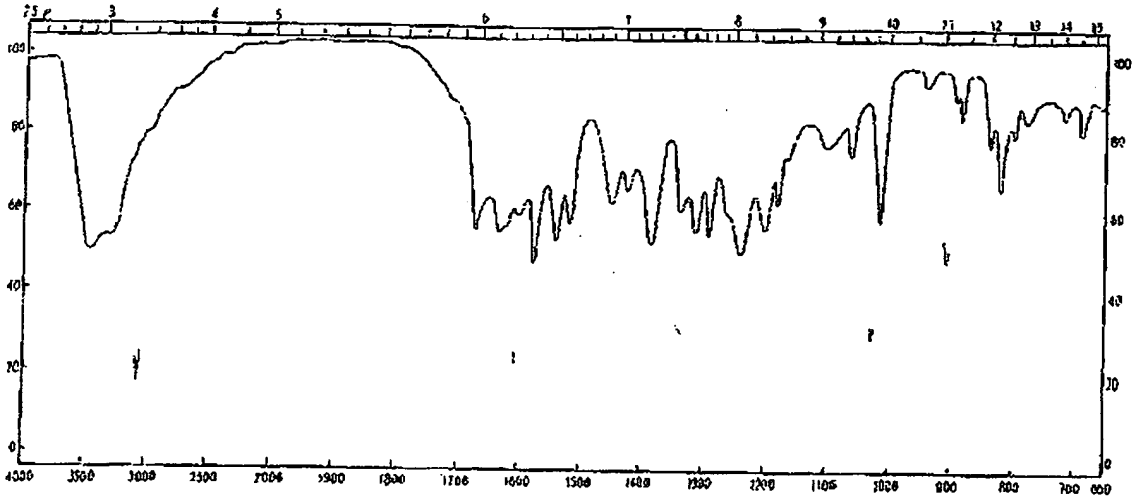
第5図

化合物(II)の赤外吸収スペクトル曲線



第6図

化合物(III)の赤外吸収スペクトル曲線



6. 添附書類の目録

(1) 明 細 書	1 通
(2) 図 面	1 通
(3) 委 任 状	1 通
(4) 願書副本	1 通
(5) 微生物受託番号通知書	1 通

7. 前記以外の発明者，代理人

(1) 発 明 者

住 所 東京都品川区東五反田5丁目21番11号
ニューフジマンション701-A

氏 名 竹 内 吉 雄

住 所 東京都世田谷区尾山町2丁目12番地

氏 名 戸 部 広 敏

(2) 代 理 人

住 所 東京都港区西新橋1丁目2番9号
三井物産館内

氏 名 朝 内 忠 夫

同 所 八木田 茂

同 所 浜 野 孝 雄

同 所 森 田 哲 二

手続補正書（自発）

昭和 49年 10月 3日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和49 年特許願第69129号

2. 発明の名称 生理活性を有するイソプタボン化合物の微生物による製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都品川区上大崎3丁目16番23号

氏名 財団法人微生物化学研究会

4. 代 理 人

住 所 東京都港区西新橋1丁目2番9号、三井物産館内

(2400) 氏 名 金 丸 義 男

5 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6 補正の内容

(1) 明細書第3頁第6行の「バー・ボンソン」を「バーキンソン」と訂正する。

(2) 同第6頁第9行の「Wilson」を「Wilcon」と訂正する。

(3) 同第7頁第8行の「バキンソン」を「バーキンソン」と訂正する。

(4) 同第10頁第7行の「。」を削除する。

(5) 同第11頁第10行の「ウォーター」の次に「67118」を加入する。

(6) 同第11頁第4行（下から）の「エードーバ」の前に「蒸留水で」を加入し、「モル／L」を「M」と訂正する。

(7) 同第11頁第3行（下から）の「モル／L」を「M」と訂正する。

(8) 同第12頁第1行の「モル／L」を「M」，「イソプ」を「イプ」とそれぞれ訂正する。

(9) 同第12頁第3～5行の「モル／L・・・を合わせ、」を削除し「Mの食台希塩酸に pH 6.1 の緩衝液を加え」を加入する。

(10) 同第12頁第5行の「アンバライト」を「アンバーライト」と訂正する。

(11) 同第12頁第12行の「エタノール」の次に「.」を加入する。

(12) 同第13頁第13行の「エチール」を「エチル」と訂正する。

(13) 同第13頁第9行の「プチール」を「ブチル」、「エチー」を「エチ」とそれぞれ訂正する。

(14) 同第14頁第5行の「ロロータ」を「マリンクロット社製シリカゲルロロータ」と補正する。

(15) 同第16頁第3行～第6行の「マリンクロット」を削除する。

(16) 同第15頁第6行の「マススペクトルグラフィー」を「マススペクトロメトリー」と補正する。

(17) 同第15頁第3行の「340」を「3400」と訂正する。

(18) 同第20頁第1行の第6行の「分子式」を「分子量及び分子式」、「300」を「300，$C_{19}H_{32}O_4$」，

「 254 」を「 254 , $C_{13}H_{10}O_4$ 」と補正する。

(10) 同第20頁第1の第5行，第7行，第10行の各「 mm 」をいずれも「 nm 」と訂正する。

(11) 同第23頁第3行の「 ExDeimental 」を「 ExDerimental 」と訂正する。

(12) 同第26頁第7行および第7行の「 プチール 」を「 ブチル 」と訂正する。

(13) 同第26頁第7行の「 シリシリツク。アンドCC-7 」を「 シリツクABCC-7. 」と補正する。

(14) 同第26頁最末行の「 分個 」を「 物質 」、「 3ケ 」を「 3個 」と訂正する。

(15) 同第27頁第8行（下から）の「 シリシリツク 」を「 シリツク 」と訂正する。

(16) 同第28頁第3行の「 メタノール 」の次に「 ・ 」を加入する。

(17) 同第28頁第7行（下から）の「 2%、 」の次に「 グルコース1%，ソイビーンミール2%， 」を加入する。

(18) 同第28頁第6行（下から）の「 を 」を削除する。

(19) 同第28頁第3行（下から）の「 し、 」の次に「 固体抗体液を合せて 」を加入する。

(20) 同第29頁第6行～第7行の「 CC-7をスペシャルーマリンクロット 」を「 マリンクロットは型シリツクABCC-7，スペシャル 」と補正する。

(21) 同第29頁第7行（下から）の「 シリシリツク 」を「 シリツク 」と訂正し、「 -7 」の次に「 . 」を加入する。

(22) 同第29頁第6行（下から）の「 メタノール 」の次に「 ・ 」を加入する。